

16.11.2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 13 JAN 2005

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 0 月 3 1 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 3 7 3 7 7 9
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 3 7 3 7 7 9]

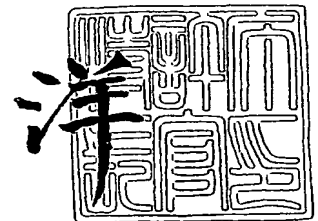
出 願 人 富 士 レ ビ オ 株 式 会 社
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 2 月 2 2 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



出 証 番 号 出 証 特 2 0 0 4 - 3 1 1 7 0 7 2

【書類名】 特許願
【整理番号】 P0837
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 5/12
G01N 33/53

【発明者】
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋浜町 2 丁目 6 2 番 5 号 富士レビオ株式会社
内
【氏名】 内田 好昭

【発明者】
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋浜町 2 丁目 6 2 番 5 号 富士レビオ株式会社
内
【氏名】 藤井 信之

【発明者】
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋浜町 2 丁目 6 2 番 5 号 富士レビオ株式会社
内
【氏名】 倉野 義裕

【発明者】
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋浜町 2 丁目 6 2 番 5 号 富士レビオ株式会社
内
【氏名】 岡田 政久

【特許出願人】
【識別番号】 000237204
【氏名又は名称】 富士レビオ株式会社
【代表者】 鈴木 博正

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 011556
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

重症急性呼吸器症候群 (Severe acute respiratory syndrome ; SARS) 原因コロナウイルスの核タンパク質に対する抗 SARS ウイルスモノクローナル抗体。

【請求項 2】

配列表 1 で表される塩基配列を組み込んだベクターから発現させた前記コロナウイルスの核タンパク質を免疫原として作成された請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 3】

寄託番号 FERM P-19572 のハイブリドーマ rSN-18、FERM P-19573 のハイブリドーマ rSN-122 又は FERM P-19574 のハイブリドーマ rSN-150 であるハイブリドーマより産生される請求項 2 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 4】

請求項 1, 2 又は 3 記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマであって、抗 SARS ウイルスモノクローナル抗体細胞と腫瘍細胞とを細胞融合させることによって得られるハイブリドーマ。

【請求項 5】

請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を固相抗体及び／又は標識抗体として用いる SARS 原因コロナウイルスの免疫測定試薬。

【書類名】明細書

【発明の名称】抗SARSウイルス抗体、該抗体を産生するハイブリドーマ及び該抗体を用いる免疫測定試薬

【技術分野】

【0001】

本発明は、重症急性呼吸器症候群（Severe acute respiratory syndrome ; SARS）原因コロナウイルス（以下SARSウイルスという）の核タンパク質に対するモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ及び、前記モノクローナル抗体を固相抗体及び／又は標識抗体として用いるSARSウイルスの免疫測定試薬に関する。

【背景技術】

【0002】

2002年から2003年にかけて、重症肺炎感染患者が世界各地で報告され、感染患者とともに多数の死亡者も報告された。患者から単離されたウイルスは、SARSウイルスと命名され、新型のコロナウイルスであることが確認された。このSARSウイルスの全遺伝子配列は、カナダ・ブリティッシュコロンビア州のマイケル・スミス・ゲノム科学センターによって解読されている（非特許文献1）。

SARS感染者は、ウイルスに感染して2日から7日の潜伏期間後、38度を超す高熱、咳、頭痛、呼吸困難などを引き起こし、一見、インフルエンザと症状が似ているため、早期にSARSウイルスによる感染か否かを判定することが求められている。SARSウイルスの感染の有無を診断する方法として、現在以下の方法が報告されている。

1) ELISAによる抗体測定法：SARS患者血清中の抗体（IgM/IgA）を、臨床症状出現後約20日以降から検出できる。

2) 免疫蛍光抗体法：SARSウイルス感染VERO細胞を用いた免疫蛍光抗体法（IgM検出）。発症後約10日後から血清中の抗体を検出できる。

3) PCR法：血液、便、気道分泌物などの様々な検体からSARSウイルス遺伝子産物を増幅して検出する。

4) 細胞培養法：SARS患者検体（気道分泌物、血液）中のウイルスをVERO細胞などの培養細胞へ感染させて検出する。

【0003】

【非特許文献1】サイエンス（Science）；2003 May 30;300(5624):1394-9.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

これまでのSARSウイルスの感染を確認する方法は、抗体検査法では感染後10日以降でなくては確認をすることができず、特に信頼性の高い蛍光抗体法は操作が煩雑であった。また、PCR法は、SARS関連遺伝子を単離して増幅する必要がある、特殊な増幅装置、測定装置を必要とし、簡便な測定法とはいえなかった。更に、細胞培養法は、多数の検体を処理することが難しく、コロナウイルスへの感染の有無は判別できるが、SARSウイルスへの感染をこの方法だけで特定することはできなかった。

本発明の目的は、上記現状に鑑み、SARSウイルスを特異的に認識するモノクローナル抗体を提供し、SARSウイルスを検出する該モノクローナル抗体を用いた免疫測定試薬を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本願発明者らは、SARSウイルスに対して特異的で高い親和力を有する抗SARSウイルスモノクローナル抗体を得るべく努力した結果、PCR法を利用した合成ヌクレオチドにより得られたSARSウイルスの核タンパク質遺伝子から遺伝子組換え技術を用いて形質転換体を作成し、これから得たSARSウイルスの核タンパク質を免疫原として用いることによって、目的のモノクローナル抗体を得、更に、このモノクローナル抗体を用いて免

疫測定試薬を確立することができた。

【0006】

本発明のモノクローナル抗体は、SARSウイルスの核タンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体である。本発明は、また、前記モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマである。本発明は、更に、前記モノクローナル抗体を検体と反応させ、結合した免疫複合体を測定することによって、SARSウイルスの核タンパク質を測定することごとを特徴とするSARSウイルスの核タンパク質の疫測定試薬である。

【発明の効果】

【0007】

本発明のモノクローナル抗体は、SARSウイルスの核タンパク質に対する特異性及び反応性が高いので、高感度な疫測定法に利用することができる。また、本発明のハイブリドーマは、SARSウイルスを特異的に認識するモノクローナル抗体を提供することができる。更に、本発明のモノクローナル抗体を用いた疫測定試薬は、簡便な操作でSARS患者由来の検体のみを拾い落としなく検出することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

以下本発明を詳述する。本発明のモノクローナル抗体は、SARSウイルスの核タンパク質に対して特異的に反応する抗体である。本発明のモノクローナル抗体を得るには、核タンパク質を免疫原として使用することができ、好ましくは核タンパク質を遺伝子組換え法に従い製造させて使用することもできる。この遺伝子組換え抗原としては、配列表の配列番号1のアミノ酸配列を実質的に含むポリペプチドを使用することができる。

【0009】

本発明においては、上記配列表の配列番号1のアミノ酸配列を実質的に含むポリペプチドを免疫原として用いることによって、SARSウイルスの核タンパク質に高い特異性を有するモノクローナル抗体を得ることができる。

【0010】

上記免疫原として用いるSARSウイルスの核タンパク質は、配列表の配列番号1のアミノ酸配列を実質的に含むポリペプチドであれば、SARSウイルスの核タンパク質の全領域であってもよく、また、必ずしも高純度に精製されたものでなくても、粗精製物であってもよい。なお、実質的に配列表の配列番号1のアミノ酸配列を含むとは、SARSウイルスの核タンパク質の機能又は立体構造に影響を及ぼさない範囲で、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列をも含むことを意味する。

【0011】

上記免疫原として用いるSARSウイルスの核タンパク質は、遺伝子組換え技術を用いた以下のような方法によって得ることができる。

SARSウイルスの核タンパク質をコードする遺伝子領域をPCR法によって増幅させ、制限酵素で切断することによって、上記配列表の配列番号1のアミノ酸配列を実質的に含むポリペプチドをコードする領域のDNA断片(配列表2)を得る。また、上記の塩基配列から、化学合成により、上記配列表の配列番号1のアミノ酸配列を実質的に含むポリペプチドをコードする領域のDNA断片を得ることも可能である。こうして得たDNA断片を、アンピシリン耐性遺伝子等の適当な標識遺伝子を有するベクターに導入して得た組み換えDNAで、大腸菌等の宿主を形質転換し、形質転換体を得ることができる。この形質転換体を培養し、培養物を精製することによって上記SARSウイルスの核タンパク質を得ることができる。

【0012】

上記モノクローナル抗体は、上記ポリペプチドを免疫原として用いて動物を免疫し、その抗SARSウイルスの核タンパク質抗体産生細胞と腫瘍細胞とを細胞融合することによって得られるハイブリドーマにより産生させることができる。

【0013】

上記ハイブリドーマは、以下の方法で得ることができる。即ち、上述のようにして得た

SARSウイルスの核タンパク質をフロイントの完全アジュバンドとともに、数回に分けて、マウス等の動物に、2～3週間おきに、腹腔内又は静脈投与することによって免疫する。次いで、脾臓等に由来する抗体産生細胞と、骨髓腫ラインからの細胞（ミエローマ細胞）等の試験管内で増殖可能な腫瘍細胞とを融合させる。

【0014】

上記融合方法としては、ケーラーとミルシュタインの常法（ネーチャー（Nature）、256巻、495頁、1975年）に従ってポリエチレングリコールによって行うことができ、又は、センダイウイルス等によって行うこともできる。

【0015】

上記融合した細胞からSARSウイルスの核タンパク質を認識する抗体を産生するハイブリドーマを選択する方法としては、以下のようにして行うことができる。即ち、上記融合した細胞から、HAT培地中で、生存している細胞をハイブリドーマとして選択することができる。次いで、上記ハイブリドーマの培養培地を、高純度に精製したSARSウイルスの核タンパク質を固定化したアッセイプレート上で反応させた後、抗マウス免疫グロブリン（Ig）等と更に反応させるEIA法等によって、SARSウイルスの核タンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択することができる。

【0016】

本発明のハイブリドーマとしては、SARSウイルスの核タンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマであれば特に限定されないが、例えば、本発明者らが上述の方法によって樹立した3種のハイブリドーマが挙げられる。

【0017】

上記3種のハイブリドーマは、それぞれ、ハイブリドーマrSN-18、ハイブリドーマrSN-122及びハイブリドーマrSN-150と命名された。

【0018】

上記各ハイブリドーマは、独立行政法人産業技術総合研究所特許微生物寄託センター〔あて名；日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-0046）〕に、ハイブリドーマrSN-18は、受託番号FERMP-19572（受託日；平成15年10月24日）、ハイブリドーマrSN-122は、受託番号FERMP-19573（受託日；平成15年10月24日）及びハイブリドーマrSN-150は、受託番号FERMP-19574（受託日；平成15年10月24日）として寄託されている。

【0019】

上記各ハイブリドーマは、通常、細胞培養に用いられる培地において培養し、培養上清からモノクローナル抗体を回収することができる。また、ハイブリドーマが由来する動物に投与することによって、腹水を貯留させ、この腹水から回収することもできる。

【0020】

上記モノクローナル抗体の回収方法としては、通常行われている精製方法を用いることができ、例えば、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、プロテインAによるアフィニティークロマトグラフィー等が挙げられる。

【0021】

上記のモノクローナル抗体は、通常の確認方法によってその反応性を確認できる。

【0022】

本発明のSARSウイルスの免疫測定試薬は、上記モノクローナル抗体を固相または標識物に結合させて検体中のSARSウイルス測定試薬を製造することができる。上記モノクローナル抗体を結合させる固相としては、従来免疫測定に用いられる各種固相であり、例えばELISAプレート、ラテックス、ゼラチン粒子、磁性粒子、ポリスチレン、ガラスなどの各種固相、ビーズ等の不溶性担体等を用いることができる。また、酵素、放射線、蛍光物質等によって標識し標識試薬を製造することができる。これらの試薬を組み合わせ、酵素免疫測定法、放射線免疫測定法、蛍光免疫測定法等に用いる試薬を製造することができる。これらの測定試薬は、サンドイッチ法又は競合的結合測定法により、検体中

の目的とする抗原を測定する試薬である。本発明のモノクローナル抗体は、メンブレンを固相とするイムノクロマトグラフィーを利用した、免疫測定試薬を製造することもできる。

【0023】

上記サンドイッチ法による免疫測定の試薬としては、例えば、本発明のモノクローナル抗体を2種用意し、そのうち1種を前記標識物とし、他の1種を前記固相に結合させた試薬を製造する。これらの試薬を測定すべき抗原を含む検体を反応させ、次いで結合した抗原に標識したモノクローナル抗体（第二抗体）を反応させ、不溶性担体に結合した標識物、即ち、標識モノクローナル抗体の量から測定すべき抗原の量を定量することにより、免疫測定を実施することができる。

【0024】

上記競合的結合測定法による免疫測定試薬としては、例えば酵素、放射線、蛍光物質等によって標識した一定量のウイルス抗原を作成する。この試薬を用いて、例えば、一定量の本発明のモノクローナル抗体、前記標識したウイルス抗原及び測定すべき抗原を含む検体とを競合的に反応させ、抗体と結合した、又は、結合しなかった標識抗原の量から測定すべき抗原の量を定量することにより免疫測定を実施することができる。抗体と結合した標識抗原を結合しなかったものと分離するためには、抗体と同種の免疫グロブリンを加え、これに対する抗体を加えて、抗体と結合した標識抗原を沈殿させ分離し、測定する二抗体法、チャーコール、ミリポアフィルターを用いる方法等によって行うことができる。

【0025】

本発明において、前記抗体又は抗原を固相又は標識物と結合させるには、物理吸着法、化学結合法等の方法に従い標識抗体又は標識抗原を作成することができる（蛋白質 核酸 酵素 別冊No.31, 37~45(1987年)参照）。

【0026】

上記試薬によって測定できる検体としては、SARSウイルスの核タンパク質を含むものであれば特に限定されず、例えば、ヒト、動物由来の血液由来の血清、血漿、全血の他、鼻腔ぬぐい液（鼻腔スワブ）、鼻腔吸引液、咽頭ぬぐい液（咽頭スワブ）等の体液抽出液、気道分泌物、細胞又は組織ホモジネート液等を挙げることができる。SARSウイルスは、哺乳動物、鳥類などからヒトへ感染したルートが疑われており、通常のヒト検体のほか、動物検体の測定によって、感染ルートの解明にも用いることができる。

【0027】

また、ヒト又は動物由来の種々の細胞、組織等を固定化し、本発明のモノクローナル抗体を反応させることによって、細胞、組織等に分布するSARSウイルスの核タンパク質を直接測定することも可能である。更に、本発明のモノクローナル抗体を用いて、いわゆるウェスタンブロッティング、アフィニティクロマトグラフィー等を行うこともできる。

【0028】

本発明のモノクローナル抗体を用いたSARSウイルスの核タンパク質の測定方法を、ヒト又は動物由来の種々の検体に適用することにより、SARSウイルス感染の診断を実施することができる。本発明のモノクローナル抗体を用いることによって、免疫化学的方法や免疫組織化学的方法により、ヒト又は動物由来の種々の体液、細胞、組織等におけるSARSウイルスの核タンパク質を直接測定することが可能となる。

【実施例】

【0029】

以下、本発明を参考例及び実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0030】

参考例1 プラスミドの作製

核タンパク質遺伝子(Nとする)は全長1270塩基対で構成されている。既に報告された遺伝子配列より、15塩基の重なりを有する50~55塩基のオリゴマーを作製し、N遺伝子のほぼ真中を水解する制限酵素NheIの前後で2つの断片に分けてPCRにて順次増幅した。前半部

分は最後のプライマーの5'側にEcoRI部位を、後半部分の3'側にBamHI部位を付加してPCRを行った。

これらの断片をQIAGEN社のPCR Purification Kitで精製し、前半部はEcoRIおよびNheI、後半部はNheIおよびBamHIで水解し、図1に示す発現用プラスミドpW6AのEcoRI-BamHI部位に挿入し、プラスミドpWS-Nを作製した。これを用い大腸菌BL21(DE3) (Brookhaven National Laboratoryより入手)を形質転換させ、アンピシリン耐性の形質転換体大腸菌BL21(DE3)/pWS-Nを得た。核タンパク質の塩基配列およびアミノ酸配列を配列表1及び2に示す。

【0031】

参考例2 組換えタンパク質(S-N)の発現

参考例1で作製した形質転換体を、50 μ g/mlのアンピシリンを含むLB培地2ml中37℃で培養した。予備培養にて600nmでODを0.6~0.8にした後0.4mM IPTGを添加し発現誘導を行い、更に3時間培養した。1.5ml量の菌体培養液を5000rpmで2分間遠心分離して菌体を集め、100 μ lの緩衝液(10mM トリス-塩酸、pH8.0、0.1M塩化ナトリウム、1mMEDTA)に懸濁し、15分間の超音波破碎により完全に菌体を破碎した。これを菌体試料とした。

菌体試料8 μ lに3倍濃度のSDSポリアクリルアミド緩衝液(0.15M トリス-塩酸、pH6.8、6% SDS、24%グリセロール、6mM EDTA、2% 2-メルカプトエタノール、0.03% プロモフェノールブルー)4 μ lを加え十分攪拌した後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。ニトロセルロースフィルターにウェスタンブロットを行って転写を行い、1%BSAによりブロッキング後、リン酸緩衝液(10mMリン酸、pH7.4、0.15M塩化ナトリウム)で1000倍に希釈したモノクローナル抗体N5を反応させた。更に、ペルオキシダーゼ酵素標識された抗マウスIgウサギポリクローナル抗体(ダコ社製)を反応させ、洗浄後10mlの基質発色液(0.01%過酸化水素水、0.6mg/ml 4-クロロ-1-ナフトール)を添加し発色させた。結果を図2に示す。

【0032】

参考例3 可溶性S-Nの精製

参考例1で作製した大腸菌BL21(DE3)/pWS-Nをアンピシリンを含むLB培地37℃条件下で培養した。予備培養にて600nmでOD約0.7の濃度にしたのち、0.4mM IPTGを添加し発現誘導を行った。18時間培養後遠心操作を行い、大腸菌を回収した。回収した大腸菌に20mM トリス-塩酸 pH8.0、1mM PMSF(フェニルメチルスルホニルフルオリド)を加え、氷冷下で超音波破碎処理を行った。遠心後、可溶性画分S-Nに硫酸アンモニウムを加え20~40%画分を回収した。この硫酸アンモニウム画分を、0.1M 塩化ナトリウム、8M 尿素、20mM リン酸緩衝液 pH6.9で平衡化したSP セファロース ファースト フロー(アマシャム社製)にアプライし、0.2M 塩化ナトリウム、8M 尿素、20mM リン酸緩衝液 pH6.9で溶出し精製した。溶出画分を0.2M塩化ナトリウム、20mM トリス-塩酸緩衝液 pH8.0で透析を行った。参考例2と同様にSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、ウェスタンブロットを行い、精製度を確認した。その結果では単一のバンドを示した。

【0033】

実施例1 抗Nタンパク質モノクローナル抗体の確立

抗Nタンパク質に対するモノクローナル抗体は、参考例3で作製したリコンビナントNタンパク質をマウスに免疫し、その脾臓リンパ球とミエローマ細胞を融合することにより作製した。すなわち、BALB/Cマウスをフロイント完全アジュバントでエマルジョン化したリコンビナントNタンパク質を50~100 μ g/マウスで初回免疫を行い、2~3週間後、フロイント不完全アジュバントでエマルジョン化した同抗原 50~100 μ g/マウスで追加免疫を行った。抗体価のチェックは、リコンビナントNタンパク質をコートした96Well ELISAプレートを用いた固相ELISAで行った。抗体価の上昇が認められたマウスにFreeのリコンビナントNタンパク質25~100 μ gを静脈内投与し、その3~4日後、マウスから脾臓を取り出し脾細胞を調製した。前もってRPMI-1640培地で培養していたマウスミエローマ細胞(P3U1)と脾細胞を1:2~1:5の比率で混合し、PEG(ペーリンガー社製)を用い細胞融合を行った。融合した細胞はHAT培地に浮遊した後、96Well培養プレートに分注し37℃ CO2イン

キュベーターで培養した。

【0034】

スクリーニングは上記に示した固相ELISAで行った。すなわち、リコンビナントNタンパク質を96Well ELISAプレート（ファルマシア社製）に1 μ g/mlの濃度で50 μ l/Well分注し、4℃ 一晚放置することにより吸着させた。1%スキムミルクでブロッキングした後、洗浄Buffer（0.05% Tween20を含むPBS）で3回洗浄し、細胞融合を行ったプレートの培養上清50 μ lを加え、37℃1時間反応させた。同様に洗浄Bufferで3回洗浄後、POD標識抗マウスイムノグロブリン抗体（DACO社製）を加え、さらに37℃1時間反応させた。洗浄Bufferで4回洗浄後、基質ABTSを加え発色の見られるWellを選択した。次に、選択したWellの細胞を24Well 培養プレートに移し37℃ CO₂ インキュベーター中で培養した後、限外希釈法にてSingle Cloneとし、以下に示す抗Nタンパク質モノクローナル抗体を産生する3種類のハイブリドーマrSN-18、rSN-122及びrSN-150を確立した。これらのハイブリドーマは、前記特許微生物寄託センターに寄託され、その寄託番号はそれぞれFERM P-19572、FERM P-19573及びFERM P-19574である。

【0035】

実施例2 ウエスタンブロッティング（WB）法によるモノクローナル抗体の反応性の確認

確立した各モノクローナル抗体のNative抗原（ウイルス由来のNタンパク質）に対する反応性は、濃縮ウイルス懸濁液をサンプルとしたWBで確認した。Vero E6細胞にSARS ウイルスHanoi株を感染させ48時間CO₂ インキュベーターで培養した後、2000rpm、15分遠心し、ウイルス培養上清（TCID₅₀は7.95 x 10⁶乗/ml）を調整した。培養上清は56℃、90分で不活性化処理を行なった後、31.5mlを日立超遠心機（40Tローター）を用いて、30Krpmで3時間遠心した。得られた沈殿にTNE（Tris-NaCl-EDTA）緩衝液（0.3ml）を加えピペッティングを行い濃縮ウイルス懸濁液を調製した。本懸濁液に等量の電気泳動用サンプル処理液を添加した後、過熱処理を行い分析用サンプルとした。12.5%ゲルにてSDSポリアクリルアミド電気泳動（SDS-PAGE）を行った後、ニトロセルロース膜に転写しWB用転写膜を作製した。転写膜はスキムミルクでブロッキングした後、抗体との反応を行った。抗Nタンパク質モノクローナル抗体としてrSN-18抗体、rSN-122抗体、rSN-150抗体を用い、無関係なモノクローナル抗体であるE2CT-38抗体を陰性コントロールとして用いてWBを実施した。抗体との反応は以下のとおりである。それぞれのモノクローナル抗体を抗原転写WB膜と室温、1時間振盪し反応を行った後、洗浄Buffer（0.05% Tween20を含むPBS）で3回洗浄（5分の振盪洗浄）した。次にPOD標識抗マウスイムノグロブリン抗体（DACO社製）を加えさらに室温、1時間反応させた。洗浄Bufferで4回洗浄（5分の振盪洗浄）後、基質4-クロロナフトール溶液を加えバンドの確認を行った。図3に示すように各モノクローナル抗体は分子量50Kd弱のNタンパク質に相当する位置にバンドが確認された。

【0036】

実施例3 サンドイッチELISA法によるウイルス培養上清中のNタンパク質の検出

リコンビナントNタンパク質及びウイルス培養上清をサンプルとしてサンドイッチELISAを行いNタンパク質測定系が成立するかどうかを確認した。ELISAは以下のように行った。すなわち、ファルコン社製ELISAプレートに各モノクローナル抗体を5 μ g/mlの濃度にPBS7.4で希釈し、1wellに50 μ lづつ入れ、4℃一晚放置しCoatした。次に1%BSA-PBS7.4を150 μ l/well入れ、37℃、1時間放置しMaskingを行った。洗浄緩衝液（0.05%Tween20含有PBS7.4）で3回洗浄後、リコンビナントNタンパク質及びウイルス培養上清を50 μ l/well入れ、37℃、1時間反応させた。リコンビナントNタンパク質は20ng/ml、培養上清はそのまま或いは洗浄Bufferで希釈して用いた。このとき、対象としてウイルスで感染させていない細胞の培養上清を陰性コントロールとして用いた。次に、実施例1で記したハイブリドーマ培養上清から抗マウスイムノグロブリン抗体アフィニティーカラムで精製したモノクローナル抗体をプール後アルカリフォスファターゼで標識した標識抗体を50 μ l/well入れ、37℃、1時間反応させた。洗浄緩衝液で3回洗浄後、基質p-ニトロフェニルフォスフェイト（

p-NPP) を $50\mu\text{l}$ /well 入れ室温で15分放置後、目視と405nmの波長を測定した。表1に示すように、全てのモノクローナル抗体においてNタンパク質の検出が可能であることが確認された。

【表1】

本発明 抗体	サンドイッチELISA 目視		サンドイッチELISA A405	
	ウイルス培 養上清	コンロー ル培養上清	ウイルス培 養上清*	リコンビナン トNタンパク
rSN-18	+	-	0.62	0.46
rSN-122	+	-	0.80	0.99
rSN-150	+	-	0.90	1.24
E2CT-38	-	-	0.05	0.10

*:4倍希釈で用いた

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】 本発明で使用した発現用プラスミド pW6A の制限酵素地図を示す図である。

【図2】 発現させた組換えタンパク質 (S-N) の測定結果を示す図である。

【図3】 WB法によるモノクローナル抗体 (rSN-18抗体、rSN-122抗体、rSN-150抗体) の反応性を確認する測定図である。

【配列表フリーテキスト】

【0038】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Fujirebio Inc.

<120> Anti SARS virus antibody

<130> P0837

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1269

<212> DNA

<213> Coronavirus

<400> 1
atgtctgata atggaccca atcaaacc aa cgtagtgcc cccgcattac atttggtgga 60
cccacagatt caactgacaa taaccagaat ggaggacgca atggggcaag gccaaaacag 120
cgccgacccc aaggtttacc caataatact gcgctcttgg tcaacagctct cactcagcat 180
ggcaaggagg aacttagatt ccctcgaggc cagggcgttc caatcaacac caatagtgg 240
ccagatgacc aaattggcta ctaccgaaga gctacccgac gagttcgtgg tggtagcggc 300
aaaatgaaag agctcagccc cagatggtag ttctattacc taggaactgg ccagaagct 360
tcacttcctt acggcgctaa caaagaaggc atcgtatggg ttgcaactga gggagccttg 420
aatacaccca aagaccacat tggcacccgc aatcctaata acaatgctgc caccgtgcta 480
caacttcctc aaggaacaac attgccaaaa ggcttctacg cagagggaag cagaggcggc 540
agtcaagcct cttctcgctc ctcatcacgt agtcgaggta attcaagaaa ttcaactcct 600
ggcagcagta ggggaaattc tctgctcga atggctagcg gagtggtga aactgcctc 660
gcgctattgc tgctagacag attgaaccag cttgagagca aagtttctgg taaaggccaa 720
caacaacaag gccaaactgt cactaagaaa tctgctgctg aggcattctaa aaagcctcgc 780
caaaaacgta ctgccacaaa acagtacaac gtcactcaag catttgggag acgtggtcca 840
gaacaaacc aaggaaattt cggggaccaa gacctaata gacaaggaac tgattacaaa 900
cattggccgc aaattgcaca atttgctcca agtcctctg cattcttgg aatgtcacgc 960

attggcatgg aagtcacacc ttcggaaca tggctgactt atcatggagc cattaaattg 1020
 gatgacaaag atccacaatt caaagacaac gtcatactgc tgaacaagca cattgacgca 1080
 tacaaaacat tcccaccaac agagcctaaa aaggacaaaa agaaaaagac tgatgaagct 1140
 cagcctttgc cgcagagaca aaagaagcag cccactgtga ctcttcttcc tgcggctgac 1200
 atggatgatt tctccagaca acttcaaaat tccatgagtg gagcttctgc tgattcaact 1260
 caggcataa 1269

<210> 2
 <211> 422
 <212> PRT
 <213> Coronavirus

<400> 2

Met Ser Asp Asn Gly Pro Gln Ser Asn Gln Arg Ser Ala Pro Arg Ile
 1 5 10 15

Thr Phe Gly Gly Pro Thr Asp Ser Thr Asp Asn Asn Gln Asn Gly Gly
 20 25 30

Arg Asn Gly Ala Arg Pro Lys Gln Arg Arg Pro Gln Gly Leu Pro Asn
 35 40 45

Asn Thr Ala Ser Trp Phe Thr Ala Leu Thr Gln His Gly Lys Glu Glu
 50 55 60

Leu Arg Phe Pro Arg Gly Gln Gly Val Pro Ile Asn Thr Asn Ser Gly
 65 70 75 80

Pro Asp Asp Gln Ile Gly Tyr Tyr Arg Arg Ala Thr Arg Arg Val Arg
 85 90 95

Gly Gly Asp Gly Lys Met Lys Glu Leu Ser Pro Arg Trp Tyr Phe Tyr
 100 105 110

Tyr Leu Gly Thr Gly Pro Glu Ala Ser Leu Pro Tyr Gly Ala Asn Lys

115

120

125

Glu Gly Ile Val Trp Val Ala Thr Glu Gly Ala Leu Asn Thr Pro Lys
 130 135 140

Asp His Ile Gly Thr Arg Asn Pro Asn Asn Asn Ala Ala Thr Val Leu
 145 150 155 160

Gln Leu Pro Gln Gly Thr Thr Leu Pro Lys Gly Phe Tyr Ala Glu Gly
 165 170 175

Ser Arg Gly Gly Ser Gln Ala Ser Ser Arg Ser Ser Ser Arg Ser Arg
 180 185 190

Gly Asn Ser Arg Asn Ser Thr Pro Gly Ser Ser Arg Gly Asn Ser Pro
 195 200 205

Ala Arg Met Ala Ser Gly Gly Gly Glu Thr Ala Leu Ala Leu Leu Leu
 210 215 220

Leu Asp Arg Leu Asn Gln Leu Glu Ser Lys Val Ser Gly Lys Gly Gln
 225 230 235 240

Gln Gln Gln Gly Gln Thr Val Thr Lys Lys Ser Ala Ala Glu Ala Ser
 245 250 255

Lys Lys Pro Arg Gln Lys Arg Thr Ala Thr Lys Gln Tyr Asn Val Thr
 260 265 270

Gln Ala Phe Gly Arg Arg Gly Pro Glu Gln Thr Gln Gly Asn Phe Gly
 275 280 285

Asp Gln Asp Leu Ile Arg Gln Gly Thr Asp Tyr Lys His Trp Pro Gln
 290 295 300

Ile Ala Gln Phe Ala Pro Ser Ala Ser Ala Phe Phe Gly Met Ser Arg
 305 310 315 320

Ile Gly Met Glu Val Thr Pro Ser Gly Thr Trp Leu Thr Tyr His Gly
325 330 335

Ala Ile Lys Leu Asp Asp Lys Asp Pro Gln Phe Lys Asp Asn Val Ile
340 345 350

Leu Leu Asn Lys His Ile Asp Ala Tyr Lys Thr Phe Pro Pro Thr Glu
355 360 365

Pro Lys Lys Asp Lys Lys Lys Lys Thr Asp Glu Ala Gln Pro Leu Pro
370 375 380

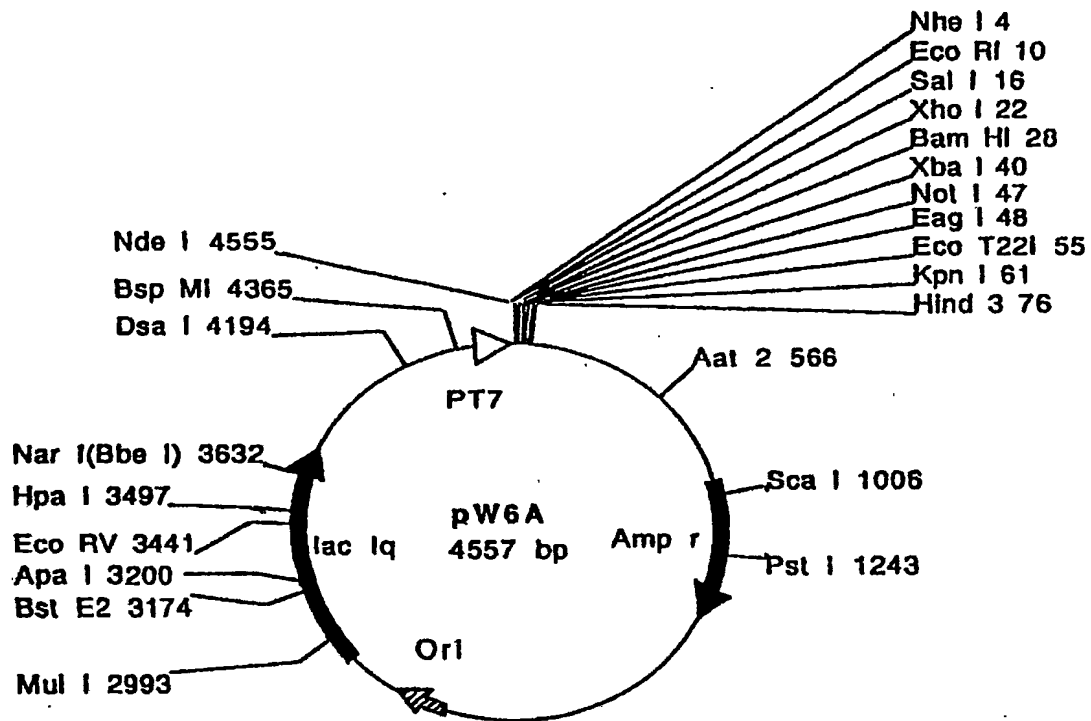
Gln Arg Gln Lys Lys Gln Pro Thr Val Thr Leu Leu Pro Ala Ala Asp
385 390 395 400

Met Asp Asp Phe Ser Arg Gln Leu Gln Asn Ser Met Ser Gly Ala Ser
405 410 415

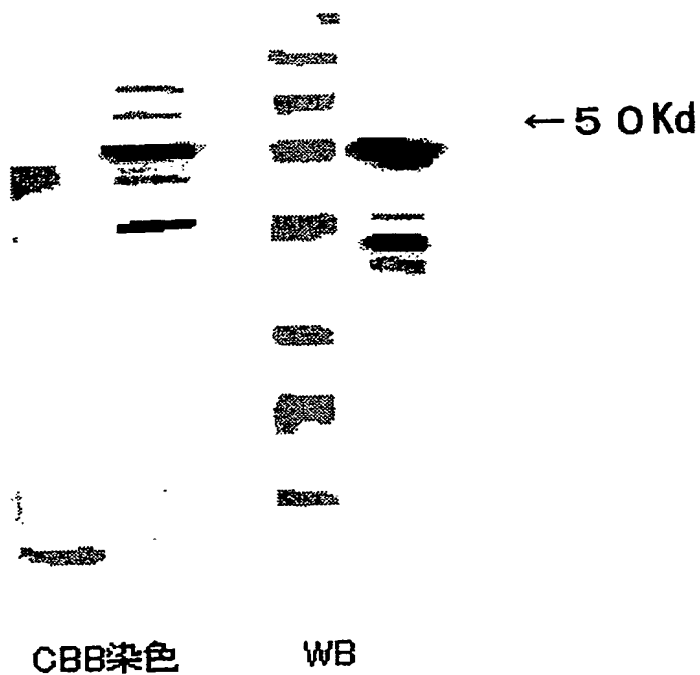
Ala Asp Ser Thr Gln Ala
420

【書類名】 図面

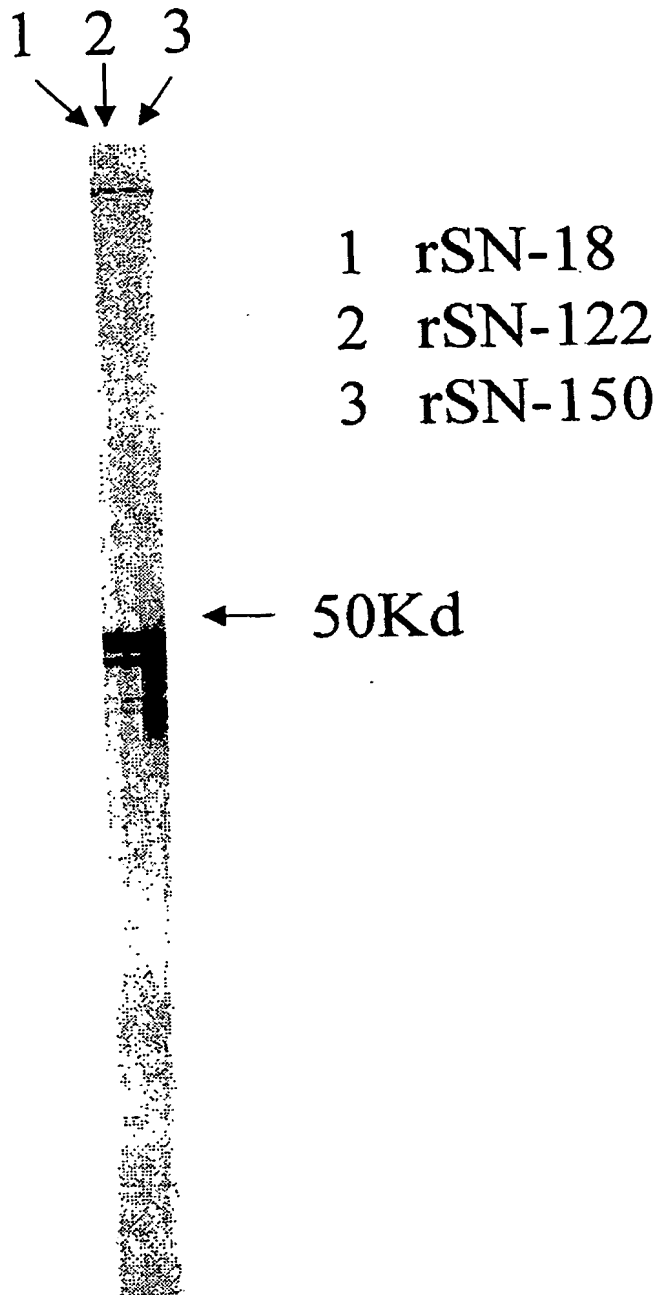
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

重症急性呼吸器症候群 (Severe acute respiratory syndrome ; S A R S) 原因コロナウイルスの核タンパク質に対するモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ及び、前記モノクローナル抗体を固相抗体及び／又は標識抗体として用いる S A R S ウイルスの免疫測定試薬を提供する。

【解決手段】

配列表 2 で表される塩基配列を組み込んだベクターから発現された前記コロナウイルスの核タンパク質を免疫原として使用し得られる S A R S ウイルスの核タンパク質 (配列表 1) と反応するモノクローナル抗体を作成する。

【選択図】 図 3

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-373779
受付番号	50301816181
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成15年11月 4日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成15年10月31日

【書類名】 手続補正書
【整理番号】 P0837
【提出日】 平成16年 1月 9日
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2003-373779
【補正をする者】
【識別番号】 000237204
【氏名又は名称】 富士レビオ株式会社
【代表者】 鈴木 博正
【手続補正1】
【補正対象書類名】 特許願
【補正対象項目名】 発明者
【補正方法】 変更
【補正の内容】
【発明者】
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋浜町 2 丁目 6 2 番 5 号 富士レビオ株式会社
内
【氏名】 内田 好昭
【発明者】
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋浜町 2 丁目 6 2 番 5 号 富士レビオ株式会社
内
【氏名】 藤井 信之
【発明者】
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋浜町 2 丁目 6 2 番 5 号 富士レビオ株式会社
内
【氏名】 岡田 政久

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-373779
受付番号	50400029959
書類名	手続補正書
担当官	鈴木 夏生 6890
作成日	平成 16 年 2 月 13 日

<認定情報・付加情報>

【補正をする者】	申請人
【識別番号】	000237204
【住所又は居所】	東京都中央区日本橋浜町 2 丁目 6 2 番 5 号
【氏名又は名称】	富士レビオ株式会社

特願 2003-373779

出願人履歴情報

識別番号

[000237204]

1. 変更年月日
[変更理由]
住 所
氏 名

1997年 5月12日
住所変更
東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号
富士レジオ株式会社